

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DE ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) ALIMENTADOS COM
MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS)**

Autora: Laís Santana Celestino Mantovani

Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ

Estado do Paraná

Fevereiro – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DE ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) ALIMENTADOS COM
MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS)**

Autora: Laís Santana Celestino Mantovani

Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração: Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M293a

Mantovani, Laís Santana Celestino

Avaliação do desempenho produtivo de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com mananoligossacarídeos (MOS) / Laís Santana Celestino Mantovani. -- Maringá, PR, 2022. 44 f.color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.

1. Zebrafish (*Danio rerio*) - Mananoligossacarídeos. 2. Probióticos - zebrafish (*Danio rerio*) - Dieta. 3. Zebrafish (*Danio rerio*) - Nutrição. 4. Modelo animal. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 639.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO E
REPRODUTIVO DE ZEBRAFISH
(*Danio rerio* ALIMENTADOS COM
MANANOLIGOSSACARIDEOS (MOS))

Autora: Lais Santana Celestino Mantovani
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 24 de fevereiro de 2022.

Prof^a Dr^a Vanessa Lewandowski

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes
de Oliveira

Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera
Barrero

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Orientador

À minha filha Lívia, que é meu sopro de esperança e meu refúgio de amor infinito durante a minha passagem pela vida. Obrigada por refrescar minha alma com seu sorriso e seus abraços minha filha, eu te amo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu esposo e amigo, Luís Eduardo, que está ao meu lado em todos os momentos, dividindo as conquistas, a felicidade, mas que também é meu porto seguro em meio as aflições e não permite que eu me abata sem antes me incentivar a tentar. Você e a Livia são a minha família.

Não poderia deixar de agradecer ao Grupo Peixegen, no qual encontrei toda a parceria e coleguismo para concluir minha pós-graduação. Obrigada!

Minha amigas Raquel, Tainara e Bruna: agradeço por todos os momentos de apoio e incentivo, sempre pronta a me mostrar o lado bom de toda dificuldade.

Obrigada ao colega Eric, por ter encarado o desafio de montar a parte física do experimento e me auxiliar com todo o acondicionamento dos animais e delineamento.

Obrigada a minha amiga querida Karla, que esteve ao meu lado durante as coletas, até os momentos finais da escrita, momentos importantes para a finalização deste trabalho.

Obrigada aos colegas nessa jornada: Filipe, Humberto, Carol, Gabriel e Simone, que tornaram os dias de coleta do grupo muito produtivos e cheios de alegria.

Agradeço o apoio do colega Luiz, que esteve presente durante as coletas e escrita, sempre solícito e apoiando. Obrigada!

Muito obrigada a colega Gisele, que participou ativamente das minhas análises estatísticas, dedicando-se a apoiar a finalização do meu projeto.

Agradeço especialmente ao meu orientador, professor Ricardo Pereira Ribeiro, pela oportunidade de trilhar esta jornada acadêmica com a leveza que foi proporcionada e poder alçar essa conquista. Ela também é do senhor, obrigada!

Obrigada professor Carlão, por toda a paciência e incentivo.

BIOGRAFIA

Laís Santana Celestino Mantovani, filha de Rubens Celestino e Marta Cristina Santana Celestino, nascida em São Paulo – SP, em 02 de fevereiro de 1991. Casada com Luís Eduardo Mantovani, mãe de Lívia C. Mantovani. Em 2009 iniciou no curso de graduação em Zootecnia pela UNESP – Campus de Dracena, quando se transferiu no ano de 2011 para a UEM, onde concluiu em março de 2016 o curso de bacharel em Zootecnia.

No ano de 2016, iniciou no mestrado em Produção Animal – com ênfase em Aquicultura, pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá – PR, concluído em 2018.

Ainda no ano de 2018, ingressou para o doutorado em Produção Animal - com ênfase em Aquicultura, pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá – PR.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | viii |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Animais como modelos experimentais..... | 1 |
| 1.2 Zebrafish como Modelo Animal..... | 2 |
| 1.3 Uso de prebióticos e probióticos na piscicultura ornamental | 4 |
| 1.4 Mananoligossacarídeos..... | 5 |
| Referências Bibliográficas..... | 7 |
| OBJETIVOS GERAIS | 11 |
| AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE ZEBRAFISH (Danio rerio) ALIMENTADOS COM MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS)..... | 12 |
| Resumo | 12 |
| Abstract..... | 13 |
| Introdução | 14 |
| Material e Métodos | 14 |

| | |
|---------------------------------|----|
| Resultados e Discussão..... | 20 |
| Conclusão | 30 |
| Referências Bibliográficas..... | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Tabela 1. Composição química da ração comercial utilizada no período experimental | 15 |
| Tabela 2. Tratamentos controle e com suplementação de MOS..... | 16 |
| Tabela 3. Estatística descritiva das características de desempenho no início do experimento | 20 |
| Tabela 4. Estatística descritiva das características de desempenho ao final da primeira etapa do experimento..... | 21 |
| Tabela 5. Coeficientes de determinação, coeficientes de regressão e p-value para o desempenho produtivo..... | 23 |
| Tabela 6. Estatística descritiva do peso total, índice hepatossomático e índice gonadossomático | 23 |
| Tabela 7. Médias e desvios-padrão para peso total, índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS), para machos e fêmeas nos diferentes tratamentos. | 24 |
| Tabela 8. Estatística descritiva da taxa de sobrevivência | 25 |
| Tabela 9. Coeficientes de determinação, coeficientes de regressão e p-value para o a desova na escala de probabilidade..... | 25 |
| Tabela 10. Médias dos ovos totais, ovos viáveis, larvas eclodidas, sobrevivência aos 7 e 21 dias após eclosão das larvas nos tratamentos avaliados | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Figura 1. Regressão do peso corporal em função dos níveis de mananoligossacarídeo adicionados a ração..... | 22 |
| Figura 2. Regressão do comprimento total em função dos níveis de mananoligossacarídeo adicionados a ração. | 23 |
| Figura 3. Probabilidade de desova em decorrência do nível de inclusão de mananoligossacarídeos (g/kg de ração)..... | 26 |
| Figura 4. Gônadas de machos e fêmeas expostos aos tratamentos com níveis de mananoligossacarídeos (0g/kg ⁻¹ A e B; 1g kg ⁻¹ C e D; 3g/ kg ⁻¹ E e F; 5g/ kg ⁻¹ G e H). Gônadas das fêmeas mostrando a presença de OAC = Oócitos alveolares corticais, OPV = Oócitos pré-vitelogênicos, OV = Oócitos vitelogênicos; Gônadas de machos com presença de SGA = espermatogônia, SPC = espermátocitos e SPD = espermátides. 28 | |

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação com mananoligossacarídeos teria influência na reprodução, avaliando os parâmetros como presença de desova, taxa de eclosão e sobrevivência das larvas de zebrafish (*Danio rerio*). A resposta aos tratamentos mostrou que o uso do aditivo obtém resultados significantes na probabilidade de desova, no entanto, foi verificado através de biometrias melhor desempenho para os animais tratados com 3g de mananoligossacarídeos por quilograma de ração, sugerindo que a suplementação seria boa opção para animais em crescimento. O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais (UEM) com duração de 78 dias. Os tratamentos consistiram em diferentes níveis de inclusão do mananoligossacarídeo em dieta comercial (32%PB e 3.000kcal/kg) aos animais, sendo um tratamento controle (2,4% de óleo vegetal) e três tratamentos com inclusão de 1, 3 e 5g/Kg de mananoligossacarídeos. Para obtenção do desempenho dos animais, foi realizada uma biometria ao início e ao fim do experimento, bem como índices hepatossomáticos e gonadossomáticos foram coletados ao final do experimento. Para a análise reprodutiva, três casais de cada tratamento foram destinados a acasalamento, dos quais foram analisados: número de desovas por tratamento, número de ovos por fêmea e taxa de eclosão. A sobrevivência das larvas de cada tratamento aos 7 e 21 dias também foi considerada. O fornecimento de 3 gramas de M.O.S. por quilograma de ração na alimentação de reprodutores de *Danio rerio* exerceu influência positiva considerando o valor absoluto, promovendo mais ovos viáveis e larvas sobreviventes.

Palavras-chave: mananoligossacarídeos, modelo animal, piscicultura ornamental, prebióticos, reprodução.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate whether the supplementation with mannanoligosaccharides influences reproduction, evaluating parameters such as the presence of hatching and survival of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. The response to the treatments showed that the use of the ingredient significantly improves the spawning probability, however, it was verified through biometrics a better performance for the animals treated with 3g of mannanoligosaccharides per ration, suggesting that supplementation would be a good option for growing animals. The experiment was carried out at the Ornamental Fish Laboratory (UEM) for 78 days. The treatments consist of different levels of mannanoligosaccharide inclusion in commercial diets (32% CP and 000kcal/kg) to the animals, being a control treatment (2.4% vegetable oil), and three treatments with the inclusion of 1.3 and 5g / kg of mannanoligosaccharides. For performance, biometry was performed at the beginning and end of the experiment, as well as hepatosomatic and gonadosomatic index were performed and end of the experiment. For the reproductive analysis, three couples of each treatment were destined for mating, which were analyzed: number of spawns per treatment, number of eggs per female and hatching rate. Larval survival of each treatment at 7 and 21 days was also considered. The supply of 3 grams of M.O.S. per kilogram of feed in the feeding of *Danio* breeders exerted a positive influence considering the absolute value, promoting more viable eggs, and surviving larvae.

Keywords: mannanoligosaccharides, animal model, ornamental fish farming, prebiotics, reproduction.

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Animais como modelos experimentais

Os modelos animais são espécies que têm potencial para serem utilizadas em experimentos que avaliam efeitos biológicos e comportamentais, gerando resultados que podem se projetar aos humanos. Muitos avanços observados em diferentes áreas científicas das quais favorecem a vida humana, somente foram viabilizados por meio da utilização de modelos animais como ferramenta experimental (Ferreira & Ferreira, 2003).

Desse modo, a seleção de um modelo animal em específico deve levar em consideração aspectos como padronização, repetibilidade, precisão de respostas avaliadas, sobrevivência da prole, disponibilidade, orçamento, facilidade de manutenção em laboratório e disponibilização de amostras biológicas (Rader, 2004).

No passado, os animais de laboratório eram utilizados basicamente como "instrumentos de trabalho", auxiliando na investigação do diagnóstico de diferentes pesquisas, sem considerar seu status genético ou sanidade (Lee et al., 2017). Com o desenvolvimento dos protocolos experimentais, esses pontos tornaram-se cruciais, demandando certo refinamento técnico, dando início a "Ciência em animais de laboratório". Nos dias atuais, a pesquisa necessita de animais que possuam condições compatíveis, e que sejam mantidos em ambientes controlados para que os parâmetros de qualidade sanitária e genética não sejam alterados, podendo assim, os resultados experimentais não serem desequilibrados em razão disso. Outro ponto muito importante é o de uniformidade dos animais em relação às variáveis genéticas, ambientais e experimentais, pois quanto mais uniforme for o lote de animais, menor será a

quantidade amostral mínima necessária para a pesquisa ser realizada, gerando o uso consciente de modelos experimentais (Silveira, 2012).

Os animais primatas possuem maior semelhança genética com os seres humanos, sendo de 95 a 98%, seguindo dos cães (85-90%), camundongos e ratos (75-80), zebrafish (70%), mosca da fruta (60%) e nematoide (40%). As espécies *Rattus norvegicus* (ratos), *Mus musculus domesticus* (camundongos), *Drosophila melanogaster* (Mosca da fruta), *Danio rerio* (Zebrafish), *Caenorhabditis elegans* (Nematoide), primatas e pintos constituem os tradicionais modelos biomédicos utilizados (Lee, 2017).

1.2 Zebrafish: espécie ornamental e modelo animal

O zebrafish (*Danio rerio*) é encontrado naturalmente no sul e sudeste da Ásia, ao redor dos rios Ganges e Brahmaputra. Caracteriza-se por habitar águas rasas e lentas, as margens de córregos e valas, particularmente adjacentes a campos de arroz. Como modelo de pesquisa, o zebrafish é encontrado em vários laboratórios ao redor do mundo, sendo que os cinco principais países de estudo são Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra, Japão e China. Seu tempo de vida geralmente varia de três a cinco anos, sendo classificado em três estágios de desenvolvimento: fase larval, juvenil e adulto. (Spence, 2008). A fase larval compreende desde a eclosão no 3º dia após a fertilização (dpf) até 30 dpf, quando são classificados como juvenis (Kimmel, 1995). A partir dos três meses são considerados adultos, e a partir de dois anos de idade, inicia-se o processo de envelhecimento quando são verificadas mudanças cognitivas, refletidas em diminuição da velocidade de aprendizagem, aumento da senescência, menor prolificidade, diminuição da capacidade generativa e dos ritmos circadianos (Fonseka, 2016).

O sequenciamento do seu genoma, realizado em 2013, demonstrou que o Zebrafish possui mais de 70% de homologia genética em relação aos humanos (Howe al., 2013), muito semelhante aos ratos, que detêm 75% de homologia (Lee, 2017), sugerindo que patologias que afetam os mamíferos podem ser modeladas nestes animais. Além da semelhança genética, o zebrafish apresenta características que favorecem sua produção e que auxiliaram no estabelecimento e popularidade de seu uso como ferramenta de pesquisa. Dentre os atributos, destacam-se a alta fecundidade com

geração de grande número de prole, rápido desenvolvimento e transparência dos embriões e larvas, robustez, tolerância a várias condições ambientais e baixo custo para mantê-lo em ambientes laboratoriais (Gama & Pimentel, 2021).

Destaca-se que as condições laboratoriais são imprescindíveis para boa manutenção e reprodução dos exemplares em cativeiro. O sucesso da reprodução do zebrafish em cativeiro é totalmente dependente da temperatura da água (26-28°C) e do fotoperíodo, com ciclo claro-escuro de 14-10h (Lee et al., 2017). O fotoperíodo exerce papel fundamental nesse processo, uma vez que na natureza, os peixes acasalam ao amanhecer, sendo que em condições laboratoriais, esse fenômeno é representado pelo início da iluminação artificial. As fêmeas produzem grande número de ovos, podendo apresentar frequência de desova semanal, com liberação de 200 a 700 ovos. Os embriões são transparentes, favorecendo os estudos relacionados à embriologia, uma vez que eles são acessíveis à manipulação e podem ser monitorados em todos os estádios de desenvolvimento sob microscopia ótica. A clareza óptica dos embriões e larvas de zebrafish oferecem vantagem em relação a outros modelos animais como ratos, nos quais os aspectos da organogênese e patologia das doenças não podem ser examinados sem intervenções como cirurgia ou exame *pós-mortem* (Lee et al., 2017). Além disso, os embriões apresentam desenvolvimento rápido, e os principais órgãos são formados em até 24 horas após a fertilização. Da mesma forma, é possível realizar o acompanhamento do desenvolvimento larval no microscópio, podendo, por exemplo, ser visualizado o fígado e outros órgãos internos (Cornet et al., 2018). Devido às características de desenvolvimento, os embriões e larvas são amplamente utilizados na pesquisa, em estudos como: toxicidade, estresse, problemas relacionados à memória, colesterol, entre outros (Macrae & Peterson, 2015).

Entretanto, devido ao seu pequeno tamanho, somente após 30 dias é possível iniciar a alimentação com ração de granulometria maior. O nível de mortalidade na fase inicial é elevado, principalmente pelo pequeno tamanho da boca que dificulta a alimentação exógena (Lee et al., 2017). Algumas lacunas no manejo desses animais são observadas, e lançar mão de suplementação alimentar que favoreça os índices reprodutivos e desenvolvimento larval, seria vantajoso para uma série de aplicações em que se utiliza a espécie como modelo. Melhor desempenho reprodutivo dos exemplares de zebrafish empregados na pesquisa deve ser ressaltado pelo desenvolvimento de um protocolo padrão de alimentação, que permita a excelência em desova e,

consequentemente a estabilidade genética das linhas de laboratório em toda comunidade científica que emprega a espécie como modelo animal.

1.3 Uso de prebióticos e probióticos na dieta de peixes

A piscicultura ornamental é um segmento em constante crescimento, aspecto que está fortemente relacionado ao aumento da demanda pelo consumidor final e ao alto lucro com a comercialização de espécies nativas e exóticas (Gomes et al., 2019). Obtendo um faturamento mundial superior a 15 milhões de dólares, em que mais de 2 bilhões de espécies ornamentais são comercializadas (Vasanthakumaran et al., 2020). Nesse âmbito, torna-se imprescindível que a produção de rações atenda em quantidade e qualidade tanto o piscicultor comercial quanto o aquarofilista.

A alimentação pode representar altos custos de produção na piscicultura ornamental, havendo a necessidade de buscar inovações que possibilitem melhorar o desempenho zootécnico, resistência a doenças, aumento da resposta imune e diminuição da mortalidade dos peixes (Firouzbakhsh et al., 2011). Entre as inovações no setor da nutrição de peixes ornamentais estão os aditivos alimentares, como as enzimas exógenas (Gomes et al., 2018), prebióticos (Abasali & Mohamad, 2011), probióticos (Firouzbakhsh et al., 2011) e simbióticos (Azevedo et al., 2016), que têm demonstrado resultados positivos sobre o desempenho e imunidade dos peixes.

Os aditivos alimentares prebióticos podem ser caracterizados como compostos não digeríveis pelo organismo animal, que são substrato seletivamente fermentado por bactérias intestinais benéficas, que auxilia na modulação da microflora intestinal do indivíduo ao beneficiar a proliferação de microrganismos benéficos em detrimento dos microrganismos patogênicos (Dionizio et al., 2002). Os oligossacarídeos frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (MOS) são os prebióticos mais utilizados na alimentação de não ruminantes (Dionizio et al., 2002). Pesquisas relacionadas à inclusão de prebióticos em dietas para peixes ornamentais são escassas, no entanto, os resultados têm demonstrado efeitos positivos sobre o crescimento e índices reprodutivos das espécies. São usados como reguladores da microbiota intestinal, imunomoduladores e promotores de crescimento.

Vários microrganismos são comumente utilizados como probióticos, entre eles leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias não ácido lácticas (Coppola & Turners,

2004). De acordo com Dias et al., (2019), a utilização de cepas das bactérias *Enterococcus faecium* (concentração de 2×10^6 UFC ml g⁻¹ na dieta) como probiótico adicionado as rações melhorou a resposta imune, o crescimento, ganho de peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar dos peixes acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) ao longo de um período de 40 dias. Maiores taxas de crescimento e desenvolvimento específicos podem implicar em diminuição do tempo de cultivo e, conseqüentemente, retorno mais rápido do capital investido na piscicultura ornamental (Gomes et al., 2017). A adição de prebiótico e simbiótico na dieta de larvas tricogáster contribuíram para redução da taxa de mortalidade. Este efeito foi atribuído principalmente a eficiência dos aditivos em aumentar a resposta imune dos peixes (Azevedo et al., 2016). Porém, pesquisas relacionadas à inclusão de aditivos alimentares nas dietas para peixes ornamentais ainda são necessárias, principalmente, pois a piscicultura ornamental trata de um segmento em que a variedade de espécies é uma característica deveras importante.

1.4 Mananoligossacarídeos

No cenário atual, com a crescente restrição do uso de antibióticos em doses terapêuticas para todos os setores de produção animal, devido à seleção de microrganismos resistentes, o uso de prebióticos surge como forma alternativa, que visa o aumento da imunidade animal e a promoção do crescimento (Furlan et al., 2004).

Um dos principais prebióticos identificados, produzidos a partir da parede celular de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são os mananoligossacarídeos (MOS).

O mananoligossacarídeo (MOS) é um carboidrato indigestível derivado de levedura, representando até 40% da matéria seca da parede celular (Halas & Noctha, 2012; Singh et al., 2018). O MOS pode ser composto somente por mananos ou estar ligado à molécula de glicose e/ou galactose, sendo chamados de glucomananos, galactomananos e galactoglucomananos (Liepman et al., 2007). O MOS possui ação prebiótica no hospedeiro, melhorando sua saúde intestinal e a absorção de nutrientes, além de ação imunomoduladora (Akter et al., 2015; Hahor et al., 2019).

Os prebióticos provindos dessa levedura são considerados promotores eficientes para a imunidade, por apresentar alta capacidade ligante, servindo como sítio de ligação competitivo para a aderência de bactérias gram-negativas que apresentam em sua estrutura Fimbrias do tipo I, as quais têm como função a fixação bacteriana. Essas

bactérias quando ligadas aos MOS, ficam impossibilitadas de se ligarem aos enterócitos, sendo eliminadas junto com as fezes (Newmann, 1994) e, desse modo, facilitando o aumento de bactérias benéficas ao hospedeiro (Oyofu et al., 1989).

Um estudo realizado por Lima (2008) constatou que a oferta de mananose na dieta de frango de corte foi eficiente para a redução significativa de colônias bacterianas patogênicas no organismo animal. Sendo assim, os MOS além de atuarem na estimulação da resposta imunológica, atuam como imunomoduladores.

Segundo Sousa (2010), o uso de MOS adicionado a dieta de tilápia-do-Nilo promove um ambiente favorável para células do sistema imune atuarem, além de agir no sistema digestivo, aumentando a área de absorção intestinal e tornando a atividade de enzimas digestivas mais eficientes, com melhor aproveitamento dos nutrientes presentes na dieta, sendo refletidos no desempenho zootécnico e na saúde dos animais.

Referências Bibliográficas

- Abasali, H., & Mohamad, S. (2011). Dietary prebiotic immunogen supplementation in reproductive performance of platy (*Xiphophorus maculatus*). *Veterinary Research (Pakistan)*, 4(3), 66-70.
- Akter, M. N., Sutriana, A., Talpur, A. D., & Hashim, R. (2016). Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, hypophthalmus. *Aquaculture international*, 24(1), 127-144. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-015-9913-8>.
- Azevedo, R. V., Fosse, J. C., Pereira, S. L., Andrade, D. R., & Vidal, M. V. (2016). Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 795-804. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8580>
- Coppola, M. D. M., & Gil-Turnes, C. (2004). Probióticos e resposta imune. *Ciência rural*, 34(4), 1297-1303.
- Cornet, C., Di Donato, V., & Terriente, J. (2018). Combining zebrafish and CRISPR/Cas9: toward a more efficient drug discovery pipeline. *Frontiers in pharmacology*, 9, 703. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00703>
- Dias, J. A. R., Abe, H. A., Sousa, N. C., Silva, R. D. F., Cordeiro, C. A. M., Gomes, G. F. E., ... & Fujimoto, R. Y. (2019). *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquaculture international*, 27(2), 463-474.
- Dionizio, M. A., Berterchini, A. G., Kato, R. K., & Teixeira, A. S. (2002). Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte-desempenho e rendimento de carcaça. *Ciência e Agrotecnologia*, 26, 1580-87.
- Ferreira, L. M., & Ferreira, L. R. K. (2003). Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta cirúrgica brasileira*, 18, 01-03.
- Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M. K., & Jani-Khalili, K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4), 833-842.

- Fonseka, T. M., Wen, X. Y., Foster, J. A., & Kennedy, S. H. (2016). Zebrafish models of major depressive disorders. *Journal of neuroscience research*, 94(1), 3-14.
- Furlan, R. L., Macari, M., & Luquetti, B. C. (2004). Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição, 5, 6-28.
- Gama, J. F., & Pimentel, I. M. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*): uma história de sucesso como modelo comportamental e bioquímico na ciência moderna.
- Gomes, V. D. S., da Silva, J. H. V., Cavalcanti, C. R., de Lima, M. C., Jordão Filho, J., & de Lima Amâncio, A. L. (2017). Enzimas exógenas na alimentação do peixe guppy (*Poecilia reticulata*). *Archives of Veterinary Science*, 22(3).
- Gomes, V. D. S., De Lima Amâncio, A. L., Jordão Filho, J., Cavalcanti, C. R., Batista, J. M. M., & da Silva, J. H. V. (2019). Índices de desenvolvimento em juvenis *Betta splendens* alimentados com aditivos enzimáticos. *Visão acadêmica*, 19(4).
- Gomes, V. D. S., de Lima Amâncio, A. L., Cavalcanti, C. R., & Batista, J. M. M. (2019). Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. *Visão acadêmica*, 20(3).
- Hahor, W., Thongprajukaew, K., & Suanyuk, N. (2019). Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas*×*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 507, 97-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.010>.
- Halas, V., & Nochta, I. (2012). Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals*, 2(2), 261-274. <http://dx.doi.org/10.3390/ani2020261>.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., & Teucke, M. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Lee, K. Y., Jang, G. H., Byun, C. H., Jeun, M., Searson, P. C., & Lee, K. H. (2017). Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Bioscience reports*, 37(3), BSR20170199. <https://doi.org/10.1042/BSR20170199>
- Li, A.H. et al. Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase-Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants. *Plant Physiology*, v. 143, n. 4, p. 1881-1893, 16 fev. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.093989>.
- Lima, H. (2008). Prebiótico na dieta de frangos de corte. *Revista Eletrônica Nutritime*, 5(4), 599-606.
- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 14(10), 721-731.
- Newman, K. (1994). Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. *Biotechnology in the feed industry*, 10, 167-174.
- Oyofa, B. A., DeLoach, J. R., Corrier, D. E., Norman, J. O., Ziprin, R. L., & Mollenhauer, H. H. (1989). Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry science*, 68(10), 1357-1360. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0681357>.
- Rader, K. (2004). *Making mice: Standardizing animals for American biomedical research, 1900-1955*. Princeton University Press.
- Silveira, T. R. D., Schneider, A. C., & Hammes, T. O. (2012). Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, 64(2), 4-5. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000200002>

- Singh, S., Singh, G., & Arya, S. K. (2018). Mannans: An overview of properties and application in food products. *International journal of biological macromolecules*, 119, 79-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.130>.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Sousa, A. D. L. D. (2010). Mananoligossacarídeo e β -glucano na suplementação dietária para juvenis de Tilápia-do-nilo mantidos em tanques-rede.
- Vasanthakumaran, M., Basu, S. B. S., Deekshanya, K., & Raja, S. (2020). Feed formulation with animal waste as supplements for ornamental fishes *Poecilia sphenops*. : <http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2020.1107.5468>

OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da inclusão de mananoligossacarídeos na dieta do zebrafish (*D. rerio*), observando o efeito de diferentes níveis de inclusão do MOS sobre o crescimento, parâmetros reprodutivos, índices hepatossomático e gonadossomáticos e características histológicas de gônadas.

AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ALIMENTADOS COM MANANOLIGOSSACARÍDEOS (MOS)

RESUMO

A piscicultura ornamental está cada vez mais difundida comercialmente, gerando demanda de produção por animais cada vez mais saudáveis e resistentes, que agradem ao consumidor final. Uma das maiores dificuldades na produção de alevinos ornamentais é a fase reprodutiva, que tem especificidades para cada espécie. De um modo geral, fornecer uma dieta adequada é o princípio do sucesso produtivo. Pensando nisso, lançar mão do uso de aditivos probióticos e prebióticos se mostra uma alternativa atrativa para promover melhora na absorção de nutrientes e atuar na imunomodulação do animal tornando-o mais resistente e podendo indiretamente agregar valor à reprodução. O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais (UEM) com duração de 78 dias. O objetivo do experimento foi avaliar a influência de adição de mananoligossacarídeos no desempenho reprodutivo do zebrafish. Os parâmetros de água foram mantidos de acordo com a exigência da espécie. Os tratamentos consistiram em diferentes níveis de inclusão do mananoligossacarídeo em dieta comercial (32%PB e 3.000kcal/kg) aos animais, sendo um tratamento controle (2,4% de óleo vegetal) e três tratamentos com inclusão de 1, 3 e 5g/Kg de mananoligossacarídeos. Para obtenção do desempenho dos animais, foi realizada uma biometria ao início e ao fim do experimento, bem como índices hepatossomáticos e gonadossomáticos foram coletados ao final do experimento. Para a análise reprodutiva, três casais de cada tratamento foram destinados a acasalamento, dos quais foram analisados: número de desovas por tratamento, número de ovos por fêmea e taxa de eclosão. A sobrevivência das larvas de cada tratamento aos 7 e 21 dias também foi considerada. Foi encontrada diferença nos parâmetros de desempenho para peso e comprimento. Observou-se aumento na probabilidade de desova junto ao nível de inclusão do MOS. O fornecimento de 3 gramas de M.O.S. por quilograma de ração na alimentação de reprodutores de *Danio rerio* exerceu influência positiva considerando o valor absoluto, promovendo mais ovos viáveis e larvas sobreviventes.

Palavras-chave: desova, desempenho, piscicultura ornamental, prebióticos, sobrevivência.

REPRODUCTION EVALUATION OF ZEBRAFISHES FED WITH MANANOLIGOSACCHARIDES (MOS)

ABSTRACT

Ornamental fish farming is increasingly commercially, generating demand for production for animals that are healthier and more resistant, to attend the final consumer. One of the biggest difficulties in the production of ornamental fingerlings is the reproductive phase, which has specificities for each species. So, providing an adequate diet is the principle of productive success. With that in mind, resorting to the use of probiotic and prebiotic additives is an attractive alternative to improve nutrient absorption and act on the animal's immunomodulation, making it more resistant and indirectly adding value to reproduction. The experiment was carried out at the Ornamental Fish Laboratory (UEM), located in Maringá, Paraná, from May 14, 2019, to July 31, 2019. The water parameters were kept according to the species requirement. The treatments consisted of different levels of mannanoligosaccharide inclusion in a commercial diet (32% CP and 3,000kcal/kg) to the animals, with a control treatment (2.4% of vegetable oil) and three treatments with inclusion of 1, 3 and 5g /Kg-1 of mannanoligosaccharides. To obtain the performance of the animals, a biometry was performed at the beginning and at the end of the experiment, as well as hepatosomatic and gonadosomatic indexes were collected at the end of the experiment. For the reproductive analysis, three couples from each treatment were destined for mating, of which the number of spawns per treatment, number of eggs per female and hatching rate were analyzed. The survival of larvae from each treatment at 7 and 21 days was also considered. A difference was found in the performance parameters for weight and length. An increase in spawning probability was observed with the MOS inclusion level. The supply of 3 grams of M.O.S. per kilogram of ration in the feeding of *Danio rerio* breeders exerted a positive influence considering the absolute value, promoting more viable eggs, and surviving larvae.

Keywords: spawning, performance, ornamental fish farming, prebiotics, survival

2 Introdução

O uso dos prebióticos na aquicultura vem sendo estudado no intuito de substituição aos antibióticos, e o principal objetivo é controle imediato da ocorrência de enfermidades, do meio aquático ao organismo animal, uma vez que o meio aquoso favorece a proliferação de microrganismos patógenos (Geraldo, 2021).

Peixes ornamentais têm seu desempenho reprodutivo facilmente comprometido por afecções e são parcela importante da piscicultura mundial. Dessa forma, avaliação de aditivos prebióticos por meio de experimentos é uma ótima forma de obter conhecimento do custo-benefício de alguns deles. Prebióticos são organismos vivos, não digeríveis no intestino, quando incorporados aos alimentos competem com patógenos pelos mesmos sítios de adesão ou ligação no epitélio intestinal e pelo consumo de nutrientes, fazendo com que estes não se desenvolvam no trato gastrointestinal, aumentando a imunidade e a resistência a patógenos (Vieites, 2020). Eles têm apresentado resultados satisfatórios de desempenho quando os animais encontram em desafio sanitário, mantendo a qualidade da microflora intestinal dos peixes.

Muito utilizado atualmente para a piscicultura, em tilápias-do-Nilo, tambaquis e peixes de cultivo em geral, o mananoligossacarídeo possui bons resultados com aumento de ganho de peso, resistência a patógenos e melhor aproveitamento nutricional (de Andrade, 2018). Para os peixes ornamentais, em que um dos gargalos é a reprodução, tornando interessante estudo que aplique os probióticos mais utilizados a fim de observar os seus efeitos nos mesmos. A espécie *D. rerio* foi escolhida por ser mundialmente difundida como animal experimental, além de ser uma espécie de peixe ornamental muito conhecida (Lee, 2017).

3 Material e Métodos

O experimento foi protocolado no comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá CEUA nº 9804221019.

3.1 Animais e período experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais da Universidade Estadual de Maringá, totalizando 78 dias de duração. Foram utilizados 320 exemplares de zebrafish de 45 dias de vida, mantidos em aquários de 30 litros, com aeração constante e ciclo claro-escuro 10-14h, conforme recomendado para a espécie (Lee, 2017).

3.2 Delineamento e dietas experimentais

O estudo foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos e quatro repetições. Os peixes foram distribuídos em 16 aquários, totalizando 20 animais por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em diferentes níveis de inclusão do mananoligossacarídeo (MOS) (produto comercial) em dieta comercial fornecida aos animais (Tabela 1), sendo um tratamento controle (ausente de MOS) mais três tratamentos com inclusão de 1, 3 e 5g/Kg⁻¹ de mananoligossacarídeos, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1: Composição química da ração comercial utilizada no período experimental, valores referentes a uma ração com 32% PB

| Composição | Valor de referência |
|-----------------|---------------------|
| Umidade | 120g |
| Proteína Bruta | 320g |
| Extrato Etéreo | 60g |
| Matéria Fibrosa | 60g |
| Matéria Mineral | 110g |
| Fósforo mínimo | 12g |
| Fósforo máximo | 16g |
| Cálcio mínimo | 18g |
| Cálcio máximo | 30g |
| Cobre | 17,50mg |
| Ferro | 100,00mg |
| Manganês | 50,00mg |
| Zinco | 120,00mg |
| Iodo | 0,80mg |
| Selênio | 0,50mg |
| Cobalto | 0,40mg |
| Colina | 1.500,00mg |
| Inositol | 125,00mg |
| Vitamina A: | 12000 UI |
| Vitamina D3: | 3.000 UI |
| Vitamina E: | 150 UI |
| Vitamina K3: | 15,00mg |

| | |
|--------------------------------|----------|
| Vitamina B1-Tiamina: | 20,00mg |
| Vitamina B2- Riboflavina: | 20,00mg |
| Vitamina B6-Piridoxina: | 17,40mg |
| Vitamina B12- Cianocobalamina: | 40,00mcg |
| Vitamina C: | 300,00mg |
| Niacina: | 100,00mg |
| Pantotenato de Cálcio: | 50,00mg |
| Biotina: | 1,00mg |
| Ácido Fólico: | 6,00mg |

Fonte: Ambar Amaral

As rações foram preparadas quinzenalmente, com o MOS sob forma de solução oleosa, aspergida sobre elas, homogeneizando-se, mantendo-se em abrigo da luz solar e/ou produtos químicos. O mesmo processo de inclusão fora realizado para o tratamento controle, utilizando apenas o óleo vegetal, na concentração de 2,4%.

Tabela 2. Tratamentos controle e com suplementação de MOS.

| Composição | 0 | 1 | 3 | 5 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Óleo vegetal | 2,4% | 2,4% | 2,4% | 2,4% |
| Manananoligossacarídeo | - | 1g/kg | 3g/kg | 5g/kg |

Os níveis 0, 1, 3 e 5 representam os tratamentos experimentais.

Fonte: Autor (2022)

Os animais eram alimentados quatro vezes ao dia, às 8h, 11h, 13h30 e às 16h de forma que não houvesse sobras, respeitando o limite de cinco minutos para que consumissem toda a ração, em cada manejo, antes de oferecer mais quantidade de alimento. Dessa forma, preservando a qualidade da água.

3.3 Metodologia experimental

Durante o período experimental foram realizadas uma biometria inicial e uma final, e foram mensurados comprimento (cm) e peso (g) de todos os animais. Para tanto, os peixes foram mantidos em jejum 24h, sendo posteriormente capturados, anestesiados em solução contendo água 100ppm de óleo de cravo (Eugenol), conforme descrito por Grush et al., (2004).

Após o período de 35 dias de alimentação com as dietas de seus respectivos tratamentos, foi realizada a biometria final para a avaliação do desempenho produtivo e dois animais de cada unidade experimental foram anestesiados em solução contendo água e 100ppm de óleo de cravo (Grush et al., 2004) e imergidos em gelo para a eutanásia, sendo destinados para coleta de material para análises dos índices hepatossomáticos (IHS) e gonadossomáticos (IGS). Para análise de IHS foi determinado através da equação $Wf/Wt.100$, em que Wf = peso de fígado (mg), Wt = peso total do animal (mg) (Wootton et al., 1978). Para análise de IGS foi determinado através da equação $IGS = [Wg/(Wt-Wg)] \times 100$, sendo Wg = peso das gônadas, Wt = peso do animal (Wootton et al., 1978).

Para avaliação dos ovos viáveis, foi realizado a observação macroscópica dos ovos após desova, verificando ovos gorados e não gorados.

Ao acaso, três casais de cada unidade experimental foram separados para acasalamento e coleta de dados dos parâmetros reprodutivos.

3.4 Histologia

Foram coletadas amostras de gônadas de quatro animais por unidade experimental ao final dos 35 dias de dieta. Os peixes foram anestesiados em solução contendo água e 100ppm de óleo de cravo (Grush et al., 2004) e imergidos em gelo para a eutanásia. As amostras coletadas foram lavadas com solução fisiológica NaCl (0,9%) e armazenadas em solução *Bouin*. Após a fixação pelo tempo determinado para cada amostra, permaneceram armazenadas em álcool 70%. O material foi então desidratado por passagem em série ascendente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para obtenção dos cortes histológicos, que foram corados com Hematoxilina e Eosina no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá.

Após a coloração, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus com ampliação de 40X e analisadas pelo software de imagem Pro Plus. Para as amostras gonadais, foi observada a maturação gonadal, segundo a proposta de Brown-Peterson et al. (2011).

3.5 Reprodução e parâmetros reprodutivos

Os casais anteriormente capturados ao acaso, foram retirados dos aquários e acondicionados em estruturas de reprodução com capacidade de 1,5l, sendo compostas de uma estrutura externa e outra interna, com fundo de tela de 1mm, de modo que ocorresse a desova, os ovos passassem pela tela, impedido a predação pelos adultos, muito comum nessa espécie.

Obtendo a desova, os ovos foram coletados, higienizados, contados e mantidos em placas de Petri, na quantidade de 50 ovos por placa. Posteriormente analisado o número de desovas por tratamento, número de ovos por fêmea e taxa de eclosão [(Número de larvas eclodidas – número total de ovos)*100].

3.6 Sobrevivência das larvas

As larvas obtidas das desovas foram acondicionadas para a observação da sobrevivência aos 07 e 21 dias pós-eclosão. Foram distribuídas em aquários de 3l de água para nadar livremente, e na medida em que os animais cresciam os níveis de água foram aumentados. No terceiro dia de eclosão, foi ofertada artêmia e ração em pó dissolvida em água desclorada. Após o 10º dia, foi ativada a aeração dos aquários para manter o oxigênio dissolvido em 5,5 mg/l para otimizar o crescimento das larvas.

3.7 Qualidade da água

Verificou-se a temperatura da água diariamente (8 e 17h) com o auxílio de um termômetro digital. Os parâmetros de pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica foram mensurados semanalmente.

3.8 Estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de F para a análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey com significância de 5% para comparação de médias. As análises de variância e o teste de médias foram realizados utilizando o pacote “ExpDes.pt” (Ferreira, 2018) do programa R (R Development Core Team, 2020). Modelo DIC:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = valor da observação;

μ = média geral associada a cada observação;

t_i = efeito do tratamento;

ε_{ij} = erro aleatório (erros de medida, fatores não controláveis, diferenças entre as unidades experimentais etc.).

MODELO DE REGRESSÃO POLINOMIAL

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 x_i^2 + \dots + \beta_k x_i^k + \varepsilon_i$$

Em que:

Y_i é a variável resposta ou dependente (valor observado em cada um dos indivíduos, neste caso peso corporal e comprimento total);

x_i é a variável independente (neste caso o nível de mananoligossacarídeo utilizado);

β_0 e β_1 correspondem aos parâmetros do modelo;

ε_i é o erro aleatório (variável que permite explicar a variabilidade existente em Y e que não é explicada por X).

4 Resultados e Discussão

Durante todo o experimento foram mensurados os parâmetros da água, estes que se mantiveram sempre controlados, com temperatura da água em torno de 28°C e pH 7, de acordo com as melhores condições para reprodução da espécie (Harper & Lawrence, 2016).

Os animais passaram por biometria inicial antes do início da dieta, para que se confirmasse a homogeneidade de todos os animais que entraram no estudo. Não houve diferença significativa de peso e comprimento entre os animais distribuídos através dos tratamentos (Tabela 3). Para os dados de desempenho final (Tabela 3), houve diferença estatística significativa ao nível de 1% (peso corporal) e 5% (comprimento total) de probabilidade pelo teste F, portanto foi realizado a análise de regressão polinomial. Isto porque existe dependência entre os efeitos dos tratamentos, ou seja, como há níveis crescentes de mananoligossacarídeo, justificando a existência de uma correspondência funcional, denominada de equação de regressão, que liga os valores dos tratamentos (X) aos dados analisados (Y). Sendo assim, pode ocorrer a tendência de aumento ao

desempenho produtivo (Y) do animal à medida que se aumenta a dose de mananoligossacarídeo (X).

Tabela 3. Estatística descritiva das características de desempenho no início e no fim do experimento.

| Características | Níveis de MOS g/kg | Média | Desvio-padrão |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Peso corporal inicial (g) | 0 | 0,385 | 0,095 |
| | 1 | 0,384 | 0,113 |
| | 3 | 0,379 | 0,137 |
| | 5 | 0,383 | 0,083 |
| Comprimento total inicial (mm) | 0 | 35,487 | 2,699 |
| | 1 | 34,730 | 2,898 |
| | 3 | 34,827 | 3,337 |
| | 5 | 35,524 | 2,397 |
| Peso corporal final (g) | 0 | 0,511 ^{ab} | 0,157 |
| | 1 | 0,474 ^b | 0,106 |
| | 3 | 0,466 ^b | 0,095 |
| | 5 | 0,546 ^a | 0,130 |
| Comprimento total final (mm) | 0 | 36,719 ^a | 2,271 |
| | 1 | 36,021 ^{ab} | 2,242 |
| | 3 | 35,248 ^b | 2,106 |
| | 5 | 36,591 ^{ab} | 2,134 |

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$).

O estudo estatístico, então, acusou diferença significativa no peso corporal quando comparados os níveis 1 e 3 ao nível 5, sendo estes (1 e 3) semelhantes ao nível 0, e os níveis 1 e 3 sem diferenças entre si. Quando analisada a característica comprimento total, observa-se diferença significativa entre os níveis 0 e 3, sendo os níveis 0 e 3 semelhantes ao 1 e 5.

As figuras 1 e 2 apresentam a regressão do peso corporal e do comprimento total, respectivamente, em função dos níveis de mananoligossacarídeo adicionados a dieta dos animais.

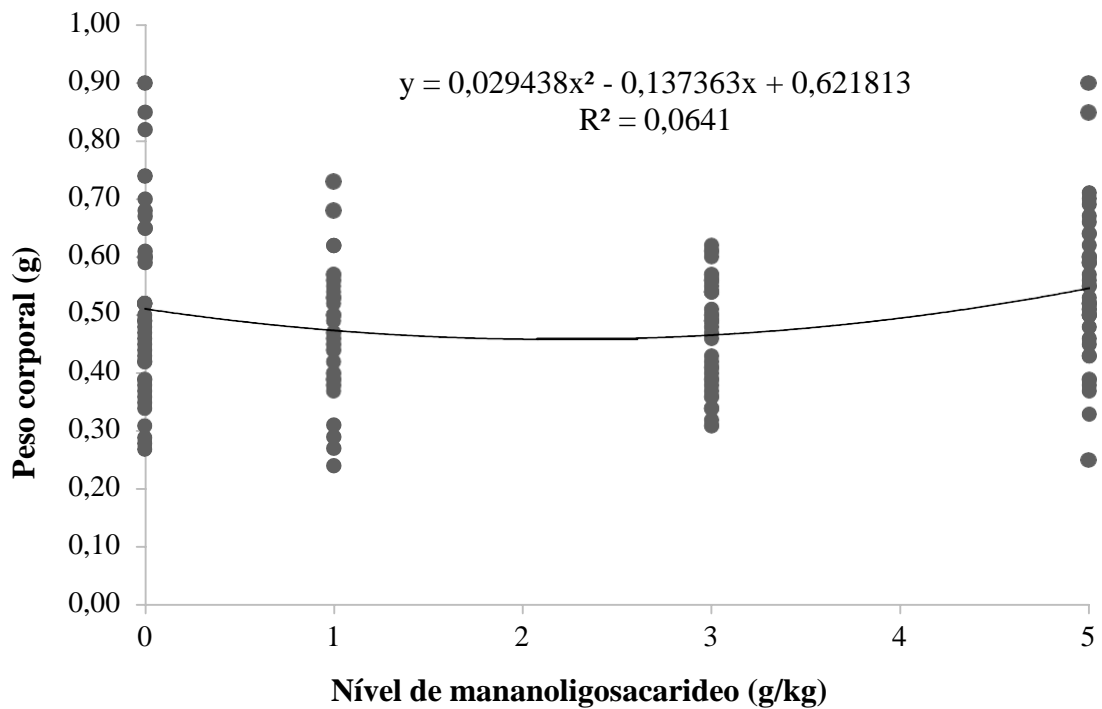


Figura 1. Regressão do peso corporal em função dos níveis de mananoligosacarideo adicionados a ração.

Conforme apresentando na figura 1 o comportamento da variável dependente (y; peso corporal) em função da variação da variável independente (x; nível de mananoligosacarideo) foi descrito pelo modelo de regressão polinomial de 2º grau, equação estimada $y = 0,6218 - 0,1374x + 0,0294x^2$; $R^2 = 0,06$ ($P < 0,01$).

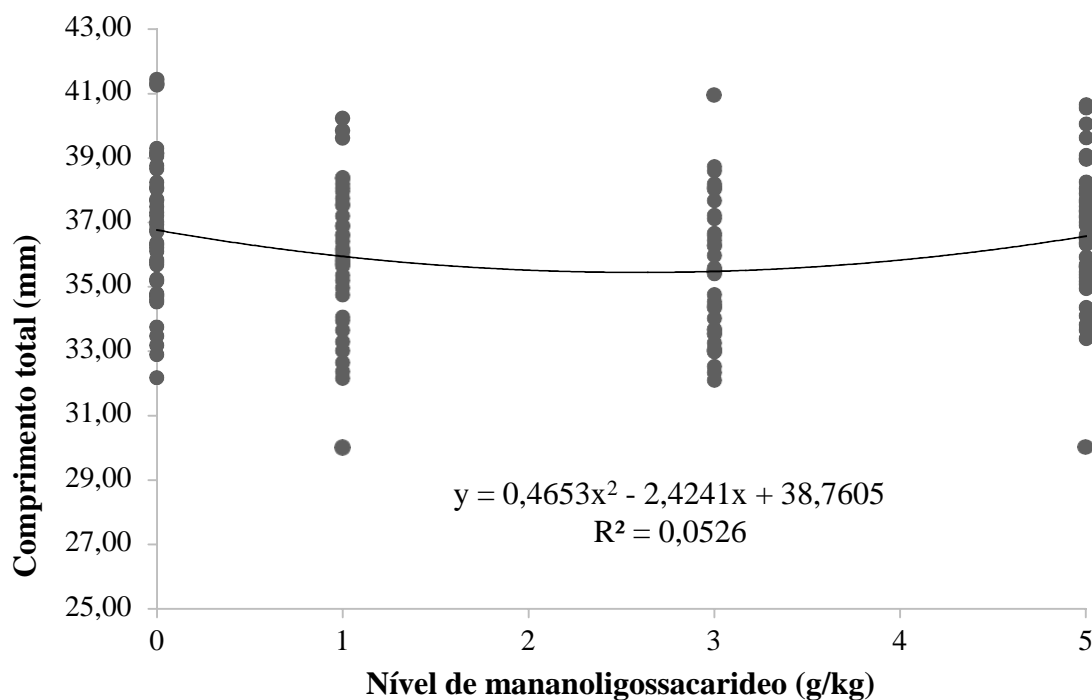


Figura 2. Regressão do comprimento total em função dos níveis de mananoligosacarideo adicionados a ração.

Conforme apresentando na figura 2 o comportamento da variável dependente (y; comprimento total) em função da variação da variável independente (x; nível de mananoligosacarideo) foi descrito pelo modelo de regressão polinomial de 2º grau, equação estimada $y = 38,7605 - 2,4241x + 0,4653x^2$; $R^2 = 0,05$ ($P < 0,05$). Na tabela 5 encontram-se os coeficientes de determinação, regressão e o valor de p para cada componente da equação de regressão. Observa-se que a equação de regressão para ambas as características foi de 2º grau, ou seja, com efeito quadrático.

Tabela 5. Coeficientes de determinação, coeficientes de regressão e *p-value* para o desempenho produtivo.

| Coeficientes | Peso corporal (g) | Comprimento total (mm) |
|-----------------------|-------------------|------------------------|
| Q ₀ | 0,6218 | 38,7605 |
| Q ₁ | -0,1374 | -2,4241 |
| Q ₂ | 0,0294 | 0,4653 |
| R ² | 0,0641 | 0,0526 |
| <i>p-value</i> Test F | 0,0157 | 0,0359 |
| <i>p-value</i> | 0,0069 | 0,0243 |

Tratamento (Quadrático)

Azevedo et al., (2016), ao avaliarem a influência da adição de prebiótico (mananoligossacarídeo – 2g/kg), probiótico (*Bacillus subtilis* - 2g/kg e simbiótico (mananoligossacarídeo – 2g/kg + *B. subtilis* – 2g/kg) em rações para larvas tricogáster (*Trichogaster leeri*) durante o período de transição alimentar, observaram que houve aumento do peso, comprimento, taxa de crescimento específico e taxa de desenvolvimento específico nas larvas que consumiram a ração com simbiótico. Dessa forma, observa-se melhora no desempenho geral de peixes ornamentais, que tiveram mananoligossacarídeos inclusos em sua dieta tanto em fase de transição alimentar, quanto em fase de crescimento.

Como observado na tabela 6, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos avaliados pela análise de variância (ANOVA). Porém, quando adicionada à informação de sexo do animal, para peso total e o índice gonadossomático (IGS), houve diferença estatística significativa a 5% e 1%, respectivamente. Essa diferença pode ser advinda da própria morfologia corporal dos machos e fêmeas.

Tabela 6. Estatística descritiva do peso total, índice hepatossomático e índice gonadossomático.

| Características | Parâmetros | Nível de MOS g/Kg | | | |
|----------------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 |
| Peso total (g) | N | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | Média | 0,644 ^a | 0,563 ^a | 0,566 ^a | 0,591 ^a |
| | DP | 0,089 | 0,118 | 0,162 | 0,186 |
| | Mínimo | 0,492 | 0,410 | 0,301 | 0,325 |
| | Máximo | 0,765 | 0,711 | 0,756 | 0,863 |
| | CV (%) | 13,871 | 20,918 | 28,540 | 31,546 |
| Índice Hepatossomático (%) | N | 7 | 6 | 8 | 7 |
| | Média | 1,881 ^a | 0,768 ^a | 0,984 ^a | 0,876 ^a |
| | DP | 2,504 | 0,723 | 1,237 | 0,746 |
| | Mínimo | 0,178 | 0,255 | 0,157 | 0,213 |
| | Máximo | 7,353 | 1,951 | 3,938 | 2,336 |
| | CV (%) | 133,091 | 94,090 | 125,708 | 85,182 |
| Índice Gonadossomático (%) | N | 7 | 6 | 7 | 7 |
| | Média | 5,923 ^a | 3,415 ^a | 3,953 ^a | 4,544 ^a |
| | DP | 3,289 | 3,993 | 3,280 | 5,920 |
| | Mínimo | 0,467 | 0,465 | 0,233 | 0,246 |

| | | | | |
|---------------|--------|---------|--------|---------|
| Máximo | 9,644 | 11,268 | 7,637 | 14,477 |
| CV (%) | 55,541 | 116,905 | 82,977 | 130,285 |

N = número de animais; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$).

Ferreira et al., (2015), avaliaram a utilização de cepa *Saccharomyces cerevisiae*, em dietas para pós-larvas de tilápias, sobre desafio sanitário (fezes de ovinos), observaram melhoras no desempenho, sobrevivência e índice hepatossomático para as pós-larvas que receberam 1g/kg^{-1} de probiótico na ração, equiparando aos peixes criados em água limpa.

Gosh et al, 2007, em estudo com *Livebearing fish* utilizando suplementação de *Bacillus subtilis* observou maiores índices gonadossomáticos, fecundidade, viabilidade e quantidade de alevinos saudáveis.

Para os parâmetros IHS e IGS, a diferença observada não é pelos tratamentos, não existindo relação entre ambos (sexo e tratamento), conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Médias e desvios-padrão para peso total, índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS), para machos e fêmeas nos diferentes tratamentos.

| Nível de MOS g/kg | Peso Total | | IHS % | | IGS % | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Macho | Fêmea | Macho | Fêmea | Macho | Fêmea |
| 0 | $0,59 \pm 0,08$ | $0,69 \pm 0,05$ | $3,23 \pm 3,68$ | $0,86 \pm 0,51$ | $3,25 \pm 2,95$ | $7,92 \pm 1,84$ |
| 1 | $0,56 \pm 0,14$ | $0,55 \pm 0,10$ | $0,98 \pm 0,82$ | $0,34 \pm 0,06$ | $1,46 \pm 0,96$ | $7,32 \pm 5,58$ |
| 3 | $0,50 \pm 0,19$ | $0,63 \pm 0,10$ | $1,57 \pm 1,60$ | $0,39 \pm 0,23$ | $0,51 \pm 0,39$ | $6,53 \pm 0,83$ |
| 5 | $0,46 \pm 0,10$ | $0,72 \pm 0,15$ | $0,66 \pm 0,36$ | $1,03 \pm 0,97$ | $0,27 \pm 0,03$ | $7,74 \pm 6,17$ |
| Total | $0,53^a \pm 0,13$ | $0,65^b \pm 0,12$ | $1,56^a \pm 1,94$ | $0,70^a \pm 0,62$ | $1,38^a \pm 1,75$ | $7,39^b \pm 3,53$ |

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$).

Para o parâmetro de sobrevivência, não houve diferença estatística entre os níveis de inclusão do mananoligossacarídeo, conforme mostra a tabela 8.

Tabela 8. Estatística descritiva da taxa de sobrevivência dos animais adultos

| Característica | Parâmetros | Nível | | | |
|--------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 |
| Sobrevivência (%) | Média | 70,75 | 75,24 | 80,18 | 77,50 |

| | | | | |
|---------------|------|------|------|------|
| DP | 6,50 | 9,31 | 5,99 | 6,45 |
| Mínimo | 65 | 65 | 75 | 70 |
| Máximo | 80 | 85 | 85,7 | 85 |

DP = desvio-padrão. Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$).

Ferreira et al., (2015), avaliaram a utilização de *Saccharomy cerevisiae*, em dietas para pós-larvas de tilápias, sobre desafio sanitário (fezes de ovinos), observaram melhorias de sobrevivência para as pós-larvas que receberam 1g/kg^{-1} de probiótico na ração comparado aos peixes não desafiados. Dessa forma, podendo afirmar que neste experimento, a nível de suplementação dos reprodutores, a adição de mananoligossacarídeos não teve influência na sobrevivência dos adultos, diferindo dos resultados de desempenho satisfatórios encontrados em larvas e pós-larvas.

Para a probabilidade de desova nas fêmeas, a tabela 9, de acordo com o aumento do nível de inclusão do mananoligossacarídeo, maior foi a probabilidade de desova, apresentando uma equação de crescimento linear (Figura 3), significativo a 7%.

Tabela 9. Coeficientes de determinação, coeficientes de regressão e *p-value* para o a desova na escala de probabilidade.

| Coeficientes | Desova | <i>p-value</i> |
|----------------------------|---------------|-----------------------|
| Q ₀ | 0,0332 | 0,00 |
| Q ₁ | 0,5912 | 0,07 |
| R ² | 0,34 | - |
| Aquário¹ | 6% | - |

¹, Quanto a variabilidade da variável dependente é por causa da covariável aquário; Probabilidade, calculada pela inversa da *logit* dos coeficientes, fórmula: $\frac{\exp(\beta)}{1+\exp(\beta)}$

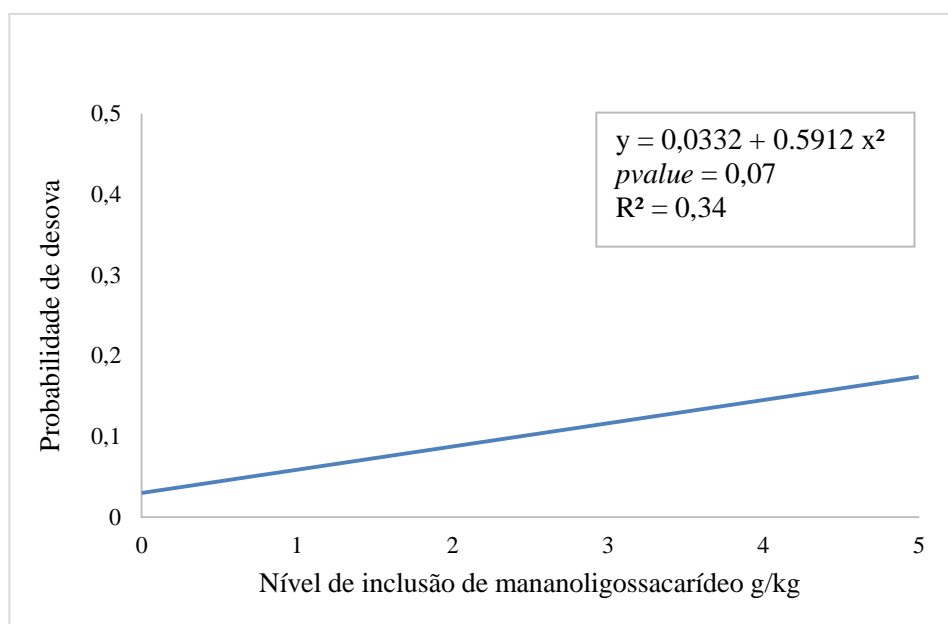


Figura 3. Probabilidade de desova em decorrência do nível de inclusão de mananoligossacarídeos (g/kg de ração).

Quanto à viabilidade da desova, analisando ovos totais, viáveis, taxa de eclosão e sobrevivência das larvas, não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém ao observar o valor absoluto pode-se notar que o desempenho do tratamento 3g/kg^{-1} se mostra superior (Tabela 10).

Tabela 10. Médias da soma dos ovos totais, ovos viáveis, larvas eclodidas, sobrevivência aos 7 e 21 dias após eclosão das larvas nos tratamentos avaliados.

| Nível | Características | | | | |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|
| | Ovos totais | Ovos viáveis | Eclosão | Sobrevivência (7 dias) | Sobrevivência (21 dias) |
| 0 | 80,00 ^a | 42,33 ^a | 26,75 ^a | 26,08 ^a | 21,58 ^a |
| 1 | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| 3 | 74,92 ^a | 71,50 ^a | 66,58 ^a | 66,08 ^a | 39,92 ^a |
| 5 | 83,25 ^a | 55,83 ^a | 31,08 ^a | 30,42 ^a | 16,50 ^a |

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p > 0,05$).

Diferente do resultado conseguido por Forsatkar et. al (2017), em que larvas do peixe zebra (*Danio rerio*) alimentadas com dietas contendo 4 g/kg de mananoligossacarídeos (MOS) obtiveram melhores índices de sobrevivência.

Abasali & Mohamad (2011) descrevem que *Platys* (*Xiphophorus maculatus*) alimentados com rações contendo prebióticos obtiveram maiores índices de produção de

larvas, fecundidade e produziram larvas com maior comprimento. Embora no presente estudo não obteve diferenças estatísticas para os parâmetros reprodutivos, deve-se levar em conta o nível de dificuldade de reprodução de cada espécie, o zebrafish não é um peixe ornamental de fácil reprodução, havendo ainda nos dias de hoje, muitos gargalos a serem sanados (Lee, et al., 2017). Dessa forma, olhando para o valor absoluto do tratamento 3, a utilização de prebióticos em dietas para reprodutores ornamentais podem de alguma forma refletir positivamente nos índices reprodutivos e na qualidade dos descendentes.

Muitos estudos relatam a utilização de probióticos na dieta de reprodutores. Gioacchini et al., 2012 e Quin et al., 2014 em seus estudos, observaram melhora na produção de ovos e taxa de fertilização de peixes comparados com outros que não utilizavam probióticos.

Para a análise histológica, pode-se observar na figura 4 o painel histológico das observações obtidas através das gônadas de fêmeas e machos.

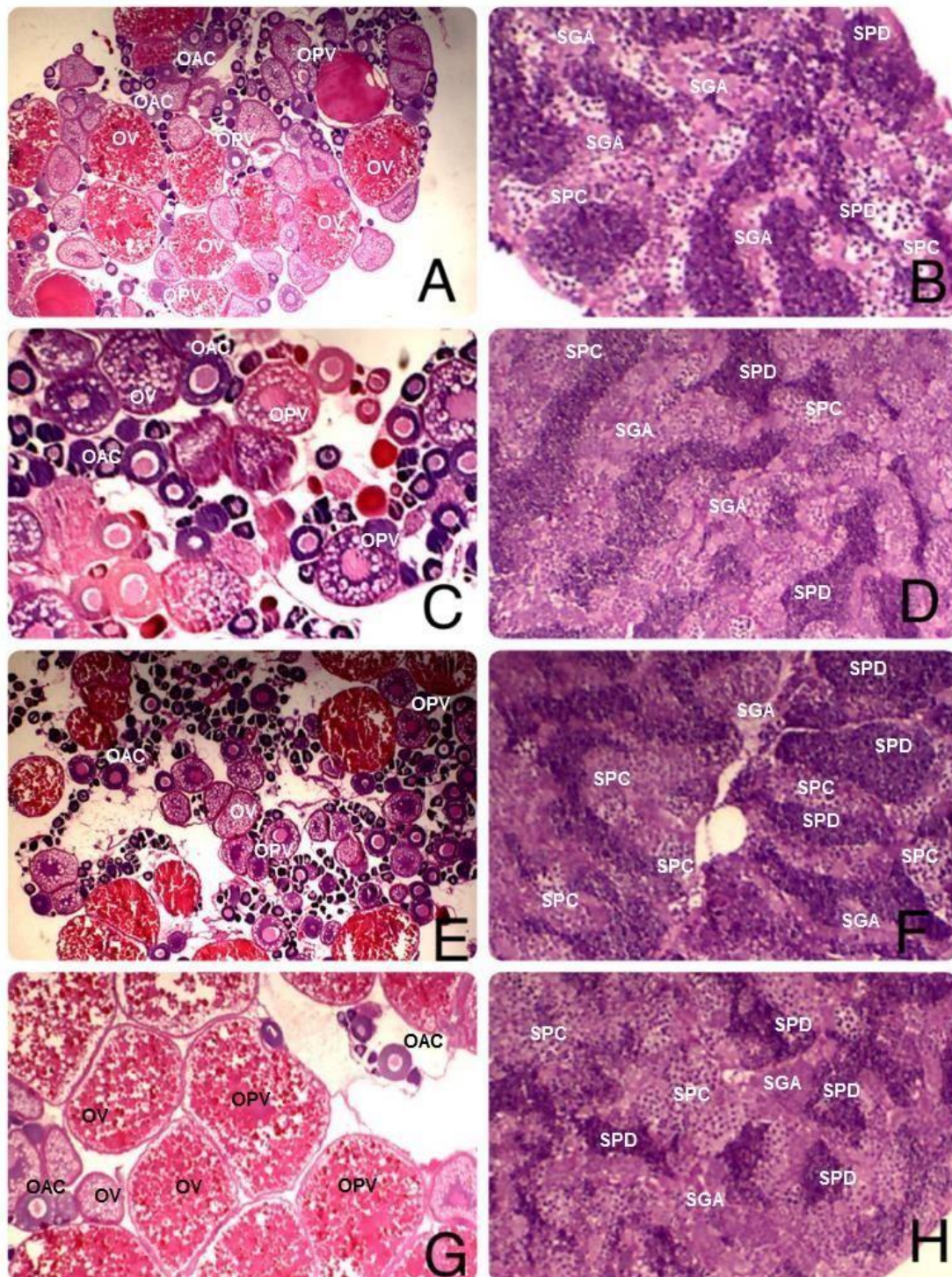


Figura 4. Gônadas de machos e fêmeas expostos aos tratamentos com níveis de mananoligossacarídeos ($0\text{g}/\text{kg}^{-1}$ A e B; $1\text{g}/\text{kg}^{-1}$ C e D; $3\text{g}/\text{kg}^{-1}$ E e F; $5\text{g}/\text{kg}^{-1}$ G e H). Gônadas das fêmeas mostrando a presença de OAC = Oócitos alveolares corticais, OPV = Oócitos pré-vitelogênicos, OV = Oócitos vitelogênicos; Gônadas de machos com presença de SGA = espermatogônia, SPC = espermatócitos e SPD = espermatídes.

Nas fêmeas de *Danio rerio* os ovários, quanto à morfologia, são órgãos pares, saciformes e sustentados dorsalmente na cavidade celômica pelo mesovário. Os ovários

direito e esquerdo unem-se na extremidade caudal para formar o ducto ovariano, que se comunica com a papila urogenital. A forma, o volume, e coloração dos ovários variam de acordo com os diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Costa, 2004). A ovogênese, em teleósteos, inicia-se com a proliferação e diferenciação de ovogônias por meio do processo mitótico. Essas células germinativas primordiais podem apresentar em ninhos ou isoladamente (Schultz et al., 2002). Apresentam citoplasma escasso, núcleo grande com nucléolo proeminente e originam ovócitos, pré-vitelogênicos e vitelogênicos. Os folículos ovarianos desenvolvem-se por processos meióticos até o completo desenvolvimento. Os folículos pós-ovulatórios são estruturas remanescentes nos ovários pós-ovulação, tendo a parede constituída por células foliculares e tecido conjuntivo (Schultz et al., 2002).

Nas fêmeas do tratamento 3g/kg nota-se uma quantidade significativa de oócitos atrésicos e grande quantidade de oócitos alveolares corticais, e indica que a gônada está produzindo novos oócitos, indicando regeneração. Nas fêmeas dos tratamentos 0g/kg⁻¹ observa-se muitos oócitos alveolares corticais, com presença de oócitos pré-vitelogênicos e oócitos vitelogênicos, indicando que as fêmeas poderiam estar aptas a reprodução. No tratamento de 5g/kg⁻¹ de mananoligossacarídeos, observa-se menor quantidade de oócitos corticais em relação aos outros tratamentos, maior presença de oócitos pré-vitelogênicos e oócitos vitelogênicos, aptos a desova.

Dessa forma, podendo afirmar que as fêmeas dos tratamentos 0 e 5 ainda entrariam em sua melhor performance reprodutiva, estando atrasadas em relação às fêmeas dos níveis 1 e 3, que apresentavam oócitos maduros, já em degeneração, sinais de desova e grande regeneração de oócitos. Corroborando com dados obtidos em histologia de ovários de zebrafish realizados por Aytekin & Yuce (2008) e estudo de Radael et al., (2016) com fêmeas da espécie *Melanotaenia boesemani* em estágio reprodutivo.

Durante a espermatogênese, as células germinais primordiais (espermatogônias) sofrem mitoses, originando os espermatócitos, os quais se dividem meioticamente, originando as espermatídes que, ao sofrerem espermiogênese, darão origem às células reprodutoras masculinas os espermatozoides (Costa, 2004). Nos machos dos tratamentos 0, 1 e 5g/kg⁻¹ nota-se alta presença de espermatogônias, que são as fases mais imaturas da formação espermática. Nos machos do nível 3, pode-se observar

poucas áreas de espermatogônias em relação às espermatídes, que representa a fase mais madura que através da espermiogênese formarão os espermatozoides.

Esses pontos observados nas gônadas dos machos e fêmeas explicam o desempenho reprodutivo do nível 3 ser superior, quando avaliado o valor absoluto dos parâmetros.

5 Conclusão

Conclui-se que o uso de mananoligossacarídeos para suplementação de zebrafish pode favorecer a reprodução, aumentando a probabilidade de desova e ser utilizado para a alimentação de juvenis, pelo efeito significativo no desempenho, melhorando a resiliência e crescimento dos animais.

6 Referências Bibliográficas

- Abasali, H., & Mohamad, S. (2011). Dietary prebiotic immunogen supplementation in reproductive performance of platy (*Xiphophorus maculatus*). *Veterinary Research (Pakistan)*, 4(3), 66-70.
- Azevedo, R. V., Fosse, J. C., Pereira, S. L., Andrade, D. R., & Vidal, M. V. (2016). Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 795-804. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8580>
- Aytekin, Y., & Yüce, R. (2008). Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 513-522. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000300010>
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724>
- Costa, A. M. (2004). Análise histológica de gónadas de carapau (*Trachurus trachurus*, Linnaeus 1758): Morfogénese e escala de maturação microscópica. *Relatórios Científicos e Técnicos, IPIMAR, Série digital*, 16, 17.
- De Andrade, L. A. R., & de Azevedo, T. M. P. (2018). Manejo experimental de alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), alimentados com ração comercial e pre/probióticos. *PUBVET*, 12, 133. [doi.org/ 10.31533/PUBVET.V12N8A159.1-9](https://doi.org/10.31533/PUBVET.V12N8A159.1-9)
- Geraldo, A. M. R., Garcêz, K. F., Hoshiba, M. A., de Araújo Pedron, F., da Cunha, L., Pretto, A., & Castagnara, D. D. (2021). Probiótico e fonte de fibra na dieta de *Ctenopharyngodon idella*. *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 21769-21782. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-066>
- Grush, J. , Noakes, D. L. G. , & Moccia, R. D. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1), 46-53. <https://doi.org/10.1089/154585404774101671>.
- Harper, C., & Lawrence, C. (2016). *The laboratory zebrafish*. Crc Press.
- Ferreira, A. H. C., Brito, J. M. D., Lopes, J. B., SANTANA, H. A. D., Batista, J. M. M., Silva, B. R., ... & Amorim, I. L. D. S. (2015). Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias-do-nilo submetidas a desafio sanitário. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 16, 430-439. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402015000200017>

- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2018). ExpDes. pt: pacote experimental designs (Portuguese). R package version 1.2. 0.
- Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., Rafiee, G., Farahmand, H., & Lawrence, C. (2017). Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology & behavior*, 180, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.010>
- G. Gioacchini, E. Giorgini, D.L. Merrifield, G. Hardiman, A. Borini, L. Vaccari, O. Carnevali, Probiotics can induce follicle maturational competence: the *Danio rerio* case, *Biol. Reprod.* 86 (2012) 1–11
- Lee, K. Y., Jang, G. H., Byun, C. H., Jeun, M., Searson, P. C., & Lee, K. H. (2017). Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Bioscience reports*, 37(3), BSR20170199. <https://doi.org/10.1042/BSR20170199>
- Vieites, F. M., Souza, C. S., Castro, A. C. S., de Melo Júnior, A. M., Ferreira, M. H., Ferreira, S. E., ... & Oliveira, G. P. (2020). Aditivos zootécnicos na alimentação de suínos—Revisão de Literatura. *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 45880-45895.
- C. Qin, L. Xu, Y. Yang, S. He, Y. Dai, H. Zhao, Z. Zhou, Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed *Lactobacillus rhamnosus* CICC 6141 and *Lactobacillus casei* BL23, *Reproduction* 147 (2014) 53–64.
- R® Development Core Team. (2020). R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Radael, M. C., Fosse, P. J., Silva, R. M. D., Fosse, J. C., Andrade, D. R. D., & Vidal, M. V. (2016). Descrição morfológica dos ovários do peixe *Melanotaenia boesemani* em atividade reprodutiva. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 893-900. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000900016>
- Schultz, Y. D., Favaro, L. F., & Spach, H. L. (2002). Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 65-76.
- Wootton, R. J.; Evans, G. W.; Mills, L. A. Annual cycle in female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) from an upland and lowland population. *Journal of Fish Biology*, v. 12, p. 331-343, 1978.